

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALVARO HENRIQUE BERNARDO DE LIMA SILVA

Efeito do tratamento com o anticonvulsivante pregabalina sobre a extinção de memória aversiva contextual e sobre respostas de ansiedade em animais diabéticos.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. JANAÍNA MENEZES ZANOVELI

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. CRISTINA APARECIDA JARK STERN

CIDADE

2018

ALVARO HENRIQUE BERNARDO DE LIMA SILVA

EFEITO DO TRATAMENTO COM O ANTICONVULSIVANTE PREGABALINA
SOBRE A EXTINÇÃO DE MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL E SOBRE
RESPOSTAS DE ANSIEDADE EM ANIMAIS DIABÉTICOS.

Trabalho de Monografia apresentado à
Universidade Federal do Paraná –
UFPR, Centro Politécnico, Setor de
Ciências Biológicas, como requisito
parcial da obtenção do título de bacharel
em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Janaina
Menezes Zanoveli

Curitiba
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos processos históricos e biológicos que, apesar das improbabilidades estatísticas, me permitiram construir esse trabalho e chegar a esse momento.

Agradeço imensamente aos meus pais, Ana Cristiane e Juvenildo Bernardo, que proporcionaram a base e o apoio necessários para que eu pudesse persistir nos meus sonhos. Sem a força, o amor, e o exemplo de vocês, eu não teria conseguido.

Um agradecimento especial a minha namorada Dayane Leticia, que acompanhou toda essa trajetória com muito amor, paciência e compreensão. Desejo que continuemos crescendo, aprendendo e nos transformando juntos, durante toda a vida.

A minha orientadora, Janaina Zanoveli, que me acolheu e me ensinou muito em todo esse processo, de forma paciente e inspiradora. Um exemplo de cientista, professora e ser humano. Muito obrigado!

Aos meus amigos e companheiros de graduação e laboratório, que compartilharam todas as dificuldades e desafios diários de se fazer ciência, com muita parceria, conhecimento e bom humor.

Agradeço a Universidade Federal do Paraná, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e a todos os professores, que contribuíram nessa grande jornada do conhecimento, compartilhando os ensinamentos da ciência e da vida.

**“Se você quiser fazer uma torta de
maçã do nada, você deve primeiro
criar o Universo.”**

Carl Sagan

RESUMO

O diabetes *mellitus* é uma doença metabólica que tem como principal característica a hiperglicemia crônica, causada pela deficiência na ação e/ou secreção do hormônio insulina. O quadro diabético pode ainda ser agravado pela ocorrência de psicopatologias como os transtornos de ansiedade e o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT). Devido às complicações, o tratamento é um dos grandes desafios para as psicopatologias ligadas ao diabetes, pois muitos pacientes se mostram resistentes e/ou refratários às abordagens de primeira linha. Neste aspecto, evidências apontam que o tratamento com drogas anticonvulsivantes, como a pregabalina podem ser uma alternativa. A pregabalina se liga seletivamente a subunidade $\alpha 2\delta$ dos canais de cálcio voltagem dependentes. Consequentemente, o canal sofre uma alteração conformacional que reduz o influxo de cálcio nos terminais nervosos, diminuindo a liberação de neurotransmissores excitatórios. Devido à ausência de trabalhos investigando memória aversiva e ansiedade em animais diabéticos, o presente estudo teve como objetivo primeiramente avaliar em animais normoglicêmicos e diabéticos os efeitos do condicionamento aversivo contextual em 3 sessões (sessões - S1, S2 e S3), sendo que a última sessão (S3) ocorria 1 semana após a S2. Em todas elas o tempo de congelamento (em segundos) foi quantificado. Imediatamente após a S3, os animais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE) para avaliar parâmetros relacionados com a ansiedade. Posteriormente, foi estudado o efeito de doses crescentes de pregabalina (0, 30 e 100 mg/kg, i.p.) em animais diabéticos submetidos ao teste de medo condicionado contextual e também no teste do LCE. Os resultados mostram que animais diabéticos possuem maior dificuldade na extinção de memória aversiva (sessões S2), sendo esta duradoura (S3), quando comparado com NGL. Observamos ainda que animais diabéticos apresentaram uma resposta do tipo ansiedade mais pronunciada, quando comparado com NGL. Já os NGL que foram condicionados ao contexto com choque nas patas (COND) demonstraram comportamento do tipo ansioso mais pronunciado do que os NGL não condicionados com choque (NCOND). Em relação ao tratamento com a pregabalina, verificamos que apenas uma única injeção de pregabalina foi capaz de acelerar a extinção da melhora aversiva. Mais ainda, este efeito foi duradouro e associado a um efeito ansiolítico também tardio (7 dias após a injeção com pregabalina). Em conjunto, os dados demonstram a importância de se aprofundar nos estudos da fisiopatologia, bem como dos mecanismos celulares envolvidos na hiperconsolidação da memória aversiva duradoura associada com o aumento de ansiedade em animais com o diabetes induzido.

Palavras chaves: diabetes, pregabalina, memória, ansiedade.

ABSTRACT

Diabetes *mellitus* is a metabolic disease characterized by chronic hyperglycemia, which may be caused by deficiency in the action and/or secretion of the hormone insulin. The disease can be further aggravated by the occurrence of psychopathologies such as anxiety disorders and posttraumatic stress disorder (PTSD). Due to these complications, treatment is a major challenge for diabetes-related psychopathologies because many patients are resistant and/or refractory to first-line approaches. In this regard, evidence suggests that treatment with anticonvulsant drugs such as pregabalin may be an alternative treatment. Pregabalin selectively binds to the $\alpha 2\delta$ subunit of calcium-dependent voltage channels. Consequently, the channel undergoes a conformational change that reduces the influx of calcium at the nerve terminals, decreasing the release of excitatory neurotransmitters. Due to the absence of studies investigating aversive memory and anxiety in diabetic animals, the present study aimed to evaluate the effects of contextual aversive conditioning in 3 sessions (sessions - S1, S2 and S3) in normoglycemic and diabetic animals. (S3) occurred 1 week after S2. In all of them the freezing time (in seconds) was quantified. Immediately after S3, the animals were submitted to the high cross maze test (LCE) to evaluate anxiety parameters. Subsequently, the effect of increasing doses of pregabalin (0, 30 and 100 mg / kg, i.p.) on diabetic animals submitted to contextual conditioned fear test and also on the LCE test was studied. The results show that diabetic animals have greater difficulty in the extinction of aversive memory (sessions S2), which is longer (S3) when compared to NGL. We also observed that diabetic animals presented a more pronounced anxiety response when compared to NGL. NGLs that were conditioned to the paw-shock context (COND) demonstrated more pronounced anxious-like than non-shock-free NGLs (NCOND). Regarding the treatment with pregabalin, we verified that only a single injection of pregabalin was able to accelerate the extinction of the aversive improvement. Moreover, this effect was long lasting and associated with an anxiolytic effect also late (7 days after pregabalin injection). Taken together, the data demonstrate the importance of delving into the pathophysiology studies as well as the cellular mechanisms involved in the hyperconsolidation of enduring aversive memory associated with increased anxiety in animals with induced diabetes

Key words: diabetes, pregabalin, memory, anxiety.

LISTA DE SIGLAS

NGL- Normoglicêmicos

DBT– Diabéticos

DM – Diabetes *Mellitus*

DMI – Diabetes *Mellitus* tipo I

DMII – Diabetes *Mellitus* tipo II

LCE –Labirinto em Cruz Elevado

SAL – Salina

SNC – Sistema Nervoso Central

SSRI – Inibidor seletivo da recaptação da serotonina

STZ – Estreptozotocina

TCA – Antidepressivo tricíclico

PGB- Pregabalina

GABA –Ácido gama-aminobutírico

TEPT – Transtorno de estresse pós-traumático

IDF - *International Diabetes Federation*

SBD – Sociedade brasileira de diabetes

COX-2 - Ciclooxigenase-2

PTGES - Prostaglandina E sintase

NF-κB - fator nuclear kappa B

AhR - Receptor de hidrocarboneto de arilo

Nrf2 - Fator nuclear derivado de eritóide 2

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Diabetes e Psicopatologias.....	9
1.2 Pregabalina.....	10
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	11
3. OBJETIVO.....	12
3.1 Objetivo Geral.....	12
3.2 Objetivos Específicos.....	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
4.1 Animais.....	13
4.2 Drogas.....	14
4.3 Indução experimental do diabetes.....	14
4.4 Medo Condicionado Contextual.....	15
4.5 Teste do labirinto em cruz elevado.....	16
4.6 Procedimentos Experimentais.....	17
4.7 Análise Estatística.....	18
5. RESULTADOS.....	19
6. DISCUSSÃO.....	24
7. CONCLUSÃO.....	28
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

1. INTRODUÇÃO

O Diabetes *mellitus* (DM) é um conjunto de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia crônica, resultante de defeitos na secreção e/ou ação do hormônio insulina (Piryaeiet al., 2015). O DM pode ser classificado em diferentes categorias: o Tipo I (DMI) corresponde a cerca de 10% dos casos e envolve a destruição das células β pancreáticas, ocasionando uma deficiência na secreção de insulina; o Tipo II (DMII) corresponde a 90% dos casos e é decorrente de uma baixa ação da insulina em seus receptores e está fortemente ligada aos hábitos alimentares e sedentarismo (Bhansaliet al., 2015). Mais ainda, há o diabetes *mellitus* gestacional, que atinge mulheres grávidas que possuem predisposição genética ou hábitos de vida não saudáveis (Associação Americana de Diabetes, 2007). Existem alguns outros tipos de diabetes que podem ter origem genética, por doenças infecciosas ou pelo uso de algumas drogas como glicocorticóides (Associação Americana de Diabetes, 2014). Por ser uma doença abrangente e multifatorial, existem diversas comorbidades e complicações crônicas associadas ao DM. Dentre essas, podemos destacar a neuropatia diabética (Tsfayeet al., 2013), a nefropatia, a retinopatia, as doenças cardiovasculares (Bertoluci et al., 2008; Pereira et al., 2009; Jazi et al., 2016) e as psicopatologias (Moulton et al., 2015; Zanolveli et al., 2015; Buchberger et al., 2016). Para este estudo, o interesse é principalmente na associação entre o diabetes e transtornos de ansiedade (Buchberger et al., 2016), bem como o diabetes e transtornos relacionados com alteração de memória aversiva, como o Transtorno do estresse pós-traumático (TEPT).

1.2 DIABETES E PSICOPATOLOGIAS

Atualmente tem se discutido a existência de uma relação bidirecional entre diabetes e psicopatologias. As alterações metabólicas causadas pelo diabetes podem levar a efeitos de longo prazo que se manifestam em nível estrutural, neurofisiológico e neuropsicológico (Muriach. M., et al., 2014). Evidências indicam que para os transtornos de ansiedade, pacientes diabéticos possuem um risco 32% maior em relação à população não diabética (Buchberger et al., 2016). Alguns estudos sugerem que o TEPT também pode ser um fator de risco para o desenvolvimento do diabetes (Weisberger et al. 2002). Sabe-se que os transtornos

relacionados ao trauma afetarão 1 em cada 4 pessoas ao longo de sua vida, sendo essa estimativa exacerbada em indivíduos com o diabetes *mellitus*, quando comparados aos indivíduos não diabéticos. Mais ainda, foi demonstrado que o diabetes induzido experimentalmente em animais leva a um comportamento do tipo ansioso mais expressivo comparado a animais normoglicêmicos (Wayhs et al., 2010, 2013; de Moraes et al., 2014; Gambeta et al., 2015), assim como também leva a danos na neurogênese hipocampal (Wang et al., 2009), sugerindo que o diabetes e tais psicopatologias compartilham mecanismos neurobiológicos comuns. Antidepressivos geralmente usados como drogas de primeira linha, como os tricíclicos (TCAs) e inibidores seletivos da receptação de serotonina (SSRIs), possuem uma baixa adesão e alta porcentagem de resistência, (Lustman e Clouse, 2002), além de desencadear efeitos adversos e interações que podem alterar a glicemia.

Devido às dificuldades clínicas do tratamento, há uma necessidade de mais estudos a fim de desenvolver novos alvos terapêuticos para melhorar a eficiência e diminuir os efeitos adversos do tratamento da ansiedade e doenças relacionadas ao trauma como o TEPT em pacientes diabéticos. Neste aspecto, a pregabalina, um anticonvulsivante, e outros anticonvulsivantes tem se destacado por se mostrarem eficazes em diversas condições onde as terapias de primeira linha com antidepressivos, não induzem uma resposta satisfatória. Tendo em vista que animais diabéticos apresentam uma série de alterações encefálicas, como alterações neuroquímicas, neuroinflamação, bem como hiperexcitabilidade neuronal levando a perda de neurônios, essas drogas atuam exatamente por inibir essa hiperexcitabilidade e conseqüentemente causando uma neuroproteção.

1.2 PREGABALINA

A pregabalina (ácido (S)-3-(aminometil)-5-metil-hexanoico) é um análogo do ácido gama-aminobutírico (GABA) usado principalmente como anticonvulsivante, mas que possui uma eficácia de amplo espectro no tratamento de condições médicas relacionadas à dor, como neuralgia pós-herpética (Dworkin et al., 2003; Sabatowskiet al., 2004), neuropatia diabética (Richter et al., 2005; Rosenstock et al., 2004), distúrbios do sono, fibromialgia (Crofford et al., 2005) e dor subsequente de lesão medular (Siddall et al., 2006). Mais ainda, evidências sugerem que a pregabalina também pode ser eficaz como um ansiolítico, em transtorno de

ansiedade generalizada e transtorno de ansiedade social (Feltner et al., 2003; Pande et al., 2003, 2004, 2000; Pohl et al., 2005).

Os mecanismos exatos de ação da pregabalina ainda não estão completamente elucidados, porém, estudos *in vitro* demonstram que a droga se liga pré-sinápticamente a subunidade proteica ($\alpha 2-\delta$) dos canais de cálcio voltagem-dependentes no sistema nervoso central (Rickels et al., 2005). Essa ligação proporciona uma alteração conformacional no canal que leva a uma redução do influxo de cálcio nos terminais nervosos, diminuindo a liberação de neurotransmissores excitatórios como o glutamato (Kavoussi, 2006), levando, portanto, a uma ação inibitória.

A análise das propriedades farmacocinéticas da pregabalina demonstra que o fármaco possui uma rápida absorção quando administrado em jejum, atingindo as maiores concentrações plasmáticas dentro de 1 hora após a administração. Sua biodisponibilidade oral foi estimada nesse período em 90%, sendo independente da dose e o tempo de meia-vida do fármaco é de 6-9 horas (Rang & Dale, 2012). Estudos pré-clínicos observaram ainda que a pregabalina atravessa a barreira hematoencefálica em camundongos, ratos e macacos. Em humanos, não foi reconhecida nenhuma ligação da pregabalina com proteínas plasmáticas e seu metabolismo não se mostrou significativo, pois não passa por metabolização hepática (HENNEMANN e SREDNI, 2016). As doses prescritas para humanos variam entre 150 a 600 mg/dia (HENNEMANN e SREDNI, 2016), o que equivale, comparando proporcionalmente a um homem de 70kg, entre 2,2 a 8,5 mg/kg.

Em conjunto, no presente estudo, tendo em vista que ainda não existem trabalhos investigando essas relações – diabetes X memória aversiva X ansiedade, foi elaborado primeiramente um experimento livre de drogas, para verificar o impacto que o condicionamento com choque nas patas teria sobre respostas comportamentais de ansiedade, se haveria uma generalização ou potencialização tardia dessa resposta. Para tal, os animais foram divididos em animais diabéticos e normoglicêmicos, em grupos que receberam choque e outro que não receberam o choque. Após esse primeiro experimento, foram realizados os testes com a pregabalina (0, 30 e 100 mg/kg) administrada (i.p.) 1 hora antes do treino de extinção de memória aversiva contextual, para verificar seus efeitos sobre a extinção dessa memória aversiva contextual. Uma resposta tardia sobre essa resposta de extinção de memória aversiva contextual e sobre parâmetros de ansiedade usando o

teste do labirinto em cruz elevado, também foi avaliada sete dias após o condicionamento aversivo contextual. O presente estudo foi conduzido, portanto, a fim de trazer uma contribuição adicional para o entendimento da relação entre esses processos fisiopatológicos associados.

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Atualmente estima-se que existam cerca de 425 milhões de pessoas diabéticas no mundo. Esses números vêm crescendo a cada ano, e segundo projeções, para 2045, o número de diabéticos no mundo pode chegar a 630 milhões, principalmente nas regiões de países em desenvolvimento (International Diabetes Federation, 2017). No Brasil, segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), existem hoje mais de 13 milhões de pessoas com diabetes, havendo nos últimos 10 anos um aumento de 61,8% no número de casos, passando de 5,5% da população em 2006 para 8,9% em 2016 (Ministério da Saúde, 2016). O transtorno de estresse pós-traumático por sua vez, também possui alto grau de prevalência na população, atingindo aproximadamente, de 8% a 9% dos indivíduos que passaram por algum evento traumático ao longo da vida (Breslau, Kessler, Chilcoat, Schultz, Davis, & Andreski, 1998). Estudos apontam ainda, que o TEPT está em terceiro lugar, dentre os quadros mais comuns de ansiedade (Kessler, et al, 2005). Essas relações aumentam a morbidade da doença causando prejuízos significativos para o indivíduo e para a sociedade. Embora existam terapias e drogas disponíveis para o tratamento desses transtornos psiquiátricos em pacientes diabéticos, como a Terapia Cognitiva-Comportamental, antidepressivos tricíclicos (TCAs) e inibidores de recaptação seletiva de serotonina (SSRIs), além de outras drogas, muitos desses pacientes não atingem uma resposta satisfatória, outros são resistentes aos tratamentos e muitos desses antidepressivos podem interagir com drogas hipoglicemiantes, alterando a glicemia de pacientes diabéticos ou até mesmo piorando outras condições associadas ao diabetes, como a hipertensão, o que pode levar ao abandono do tratamento. Esses dados ressaltam a necessidade de novos alvos farmacológicos para melhorar a eficiência do tratamento da ansiedade e doenças relacionadas ao trauma como o transtorno do estresse pós-traumático (TEPT) em pacientes diabético.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo buscou explorar o impacto que o condicionamento com choque nas patas teria sobre respostas comportamentais de memória aversiva e ansiedade, se haveria uma generalização ou potencialização tardia dessas respostas. Mais ainda, o efeito imediato e tardio do anticonvulsivante pregabalina na extinção do medo condicionado contextual em animais diabéticos, utilizando um modelo animal para o estudo do TEPT e também sobre respostas comportamentais relacionadas com a ansiedade.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do condicionamento com choque nas patas sobre respostas comportamentais tardias de memória e ansiedade em ratos normoglicêmicos e diabéticos.
- Avaliar o efeito imediato da pregabalina (diferentes doses) na extinção de memória de medo condicionado contextual em ratos diabéticos.
- Avaliar o efeito tardio (7 dias após o condicionamento com choque) da pregabalina (diferentes doses) na extinção de memória de medo condicionado contextual em ratos diabéticos.
- Avaliar o efeito prolongado da pregabalina 7 dias após o condicionamento com choque, sobre respostas comportamentais relacionadas com a ansiedade em ratos diabéticos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

A metodologia apresentada nesse estudo foi submetida para aprovação pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO-UFPR nº 1176). Todavia, importante ressaltar que são metodologias empregadas frequentemente no nosso laboratório e que possuem a aprovação do CEUA/BIO-UFPR. Foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar* pesando entre 180 - 220 g provenientes do Biotério Central da

Universidade Federal do Paraná. Estes animais foram mantidos em condições controladas de iluminação, com água e alimentação (ração Nuvilab CR₁ – Nuvital Nutrientes S/A) *ad libitum*. Foram mantidos quatro ratos por caixa (60x25x15 cm), com a maravalha trocada diariamente devido a poliúria induzida pela condição diabética.

4.2 Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas:

- Estreptozotocina (Cayman)– 60 mg/kg (i.p.): agente indutor do diabetes tipo 1 (ver metodologia abaixo);
- Pregabalina (Pfizer)– 0, 30 e 100 mg/kg (ip): anticonvulsivante; foi suspendida em salina estéril 0,9% e preparada imediatamente antes da administração, em um volume de 2 ml/kg de peso corporal. As doses foram escolhidas com base em estudos anteriores (Field et al., 2001; Zohar et al., 2008).

4.3 Indução experimental do diabetes

Diabetes foi induzido por uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de estreptozotocina (STZ; 60 mg/Kg, i.p.; diluída em tampão citrato, 10mM, pH 4.5) em ratos previamente submetidos a jejum de 12 horas. Após o procedimento de indução, os animais foram mantidos ainda, 3 horas em jejum, a fim de se evitar a competição da estreptozotocina com a glucose pelo receptor GLUT2 na célula beta pancreática. A condição diabética foi confirmada 3 dias após o tratamento com STZ por meio da aplicação de 5µL de sangue da veia caudal à fitas de teste impregnadas com glucose oxidase (Accu-CheckActive™, Roche). Animais normoglicêmicos receberam somente tampão citrato (10mM, pH 4.5, volume equivalente). Apenas ratos com níveis de glucose no sangue $\geq 250\text{mg/dL}$ foram considerados diabéticos e mantidos no estudo.

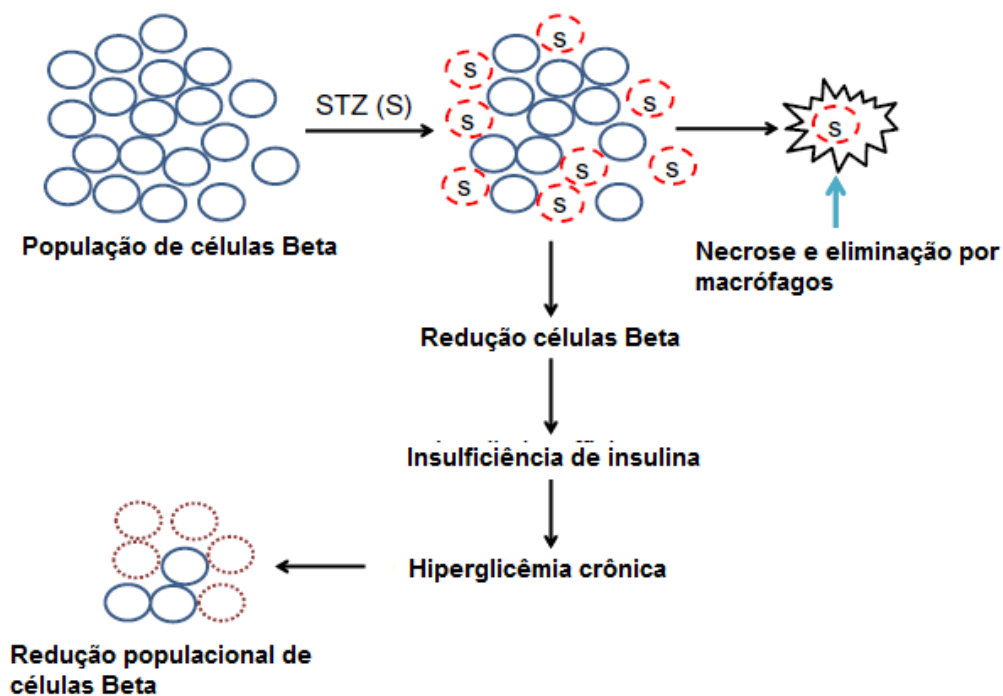


Figura 1. Esquema da destruição parcial de células β por ação da streptozotocina (STZ), induzindo a deficiência de insulina e hiperglicemia crônica.

4.4 Medo condicionado contextual

A câmara utilizada para o condicionamento consiste de uma caixa (26 x 31,5 x 21 cm; Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Três lados da caixa são de aço e a quarta é de acrílico, possibilitando assim a filmagem do período do teste para análise posterior. O chão da câmara consiste de finas barras de metal conectadas a um estimulador elétrico que pode liberar choques elétricos nas patas dos animais com intensidade e tempo previamente estabelecidos.

- Sessão de condicionamento: A sessão de condicionamento de medo contextual foi conduzida expondo o animal à câmara por 3 minutos recebendo um choque elétrico nas patas (1,0 mA, com duração de 3s) com intervalos de 30s entre os choques. Os animais ainda foram mantidos por mais um minuto na câmara após o último choque antes de serem retornados para suas caixas.

- Três sessões teste de reexposição (S1, S2 e S3): As duas primeiras sessões foram realizadas com intervalos de 24 horas entre elas, expondo os animais na câmara, mas sem o estímulo incondicionado (sessões de extinção).

- Primeira sessão (S1): os animais permaneceram na câmara durante 20 minutos e a análise foi feita através do tempo de congelamento dos animais, definido como o tempo de completa imobilidade numa posição estereotipada de agachamento, exceto por movimentos necessários para a respiração do animal.

- Segunda sessão (S2): teste de extinção de 3 minutos foi realizado 24 horas depois da S1, sem a injeção de qualquer droga, para investigar se o efeito das drogas na extinção da memória aversiva é agudo ou persistente (Bitencourt et al., 2008).

-Terceira sessão (S3): teste de extinção de 3 minutos foi realizado 7 dias após a última sessão de extinção (S2), sem a injeção de qualquer droga, para investigar o efeito a longo prazo da droga na extinção da memória aversiva.

4.5 Teste do labirinto em cruz elevado

Para avaliação do comportamento relacionado com ansiedade os animais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado imediatamente após a S3. O teste foi realizado conforme descrito por Pellow et al. (1985) O aparato utilizado consiste em uma plataforma de madeira, elevada a 50 cm do chão, o qual apresenta 4 braços, sendo 2 abertos e 2 fechados apresentando no cruzamento entre os braços há uma área central de 10cm². Para a realização desse teste, os animais são colocados individualmente no centro do aparato e por 5 minutos são gravados seus movimentos. Após as filmagens é avaliado o número de entradas nos braços fechados, o tempo de permanência nos braços abertos, o número de vezes que o animal projeta a cabeça para fora do braço aberto e o tempo de permanência no final do braço aberto. O número de entradas nos braços fechados é uma medida da atividade locomotora dos animais e o tempo em que cada animal permaneceu nos braços abertos e os outros parâmetros, são medidas de ansiedade.

4.6 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

EXPERIMENTO 1: Efeito do condicionamento com choque nas patas sobre respostas de ansiedade em animais normoglicêmicos e diabéticos.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos:

- 1) Controles Normoglicêmicos não condicionados com choque + Salina (N=11);
- 2) Normoglicêmicos condicionados com choque + Salina (N=13);
- 3) Controles diabéticos não condicionados com choque + Salina (N=12);
- 4) Diabéticos condicionados com choque + Salina (N=13).

Nesse experimento os animais receberam injeção intraperitoneal de salina (0,9%) 1 hora antes do treino de extinção (S1). Todos os grupos foram expostos cronologicamente aos mesmos procedimentos experimentais.

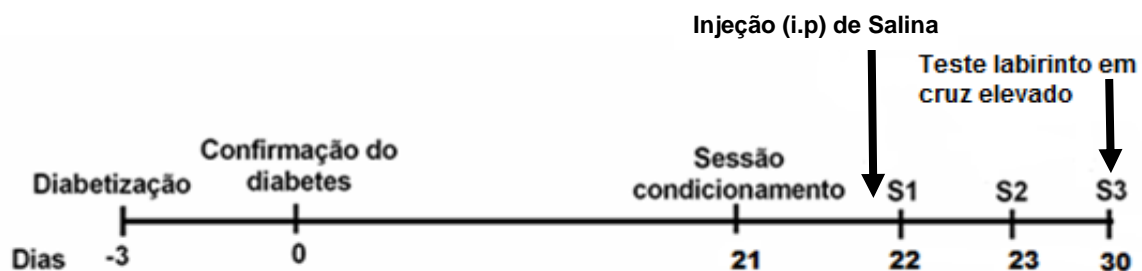


Figura 2. Linha temporal das Sessões testes (S1 = sessão de treino de extinção; S2 = sessão de extinção; S3 = sessão de recuperação de memória e teste do labirinto em cruz elevado). Os testes ocorreram após a administração i.p. de salina.

EXPERIMENTO 2: Efeito do tratamento com Pregabalina sobre a extinção de memória aversiva contextual e sobre o comportamento do tipo ansioso.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos:

- 1) Controles Normoglicêmicos + Salina (N=9);
- 2) Controles Diabéticos + Salina (N=10);
- 3) Diabéticos + Pregabalina 30 mg/kg (N=12);
- 4) Diabéticos + Pregabalina 100 mg/kg (N=12).

Os animais foram tratados com pregabalina ou salina 1hr antes de serem avaliados no treino de extinção (S1).



Figura 3. Linha temporal das Sessões testes (S1 = sessão de treino de extinção; S2 = sessão de extinção; S3 = sessão de recuperação de memória e teste do labirinto em cruz elevado). Os testes ocorreram após a administração i.p. de pregabalina (30, 100 mg/kg) ou veículo salina 1 hora antes do treino de extinção.

3.3 Análise estatística

Experimento 1:

- Os resultados de glicemia, ganho de peso (FIGURA 4), e de extinção da memória aversiva contextual (FIGURA 5), foram analisados pelo teste *t student*.
- No teste do labirinto em cruz elevado (FIGURA 6), foi realizada análise de variância (ANOVA) de duas vias, considerando as variáveis independentes (DBT/NGL e COND/NCOND), e o tempo de congelamento como variável dependente. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Experimento 2:

- Os resultados de glicemia, ganho de peso (FIGURA 4), foram analisados pelo teste *t student*.
- Os resultados dos experimentos das sessões teste de memória aversiva contextual (FIGURA 8), e teste do labirinto em cruz elevado (FIGURA 9), foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma via seguido do teste *post hoc* de Newman-Keuls. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

EXPERIMENTO 1

Parâmetros de glicemia e ganho de peso de animais normoglicêmicos e diabéticos

O teste *t* de Student mostrou que animais diabéticos possuem um aumento significativo da glicemia (Figura 4.A; $p < 0,05$) e redução do ganho de peso (FIGURA 4.B; $p < 0,05$) quando comparados aos animais normoglicêmicos.

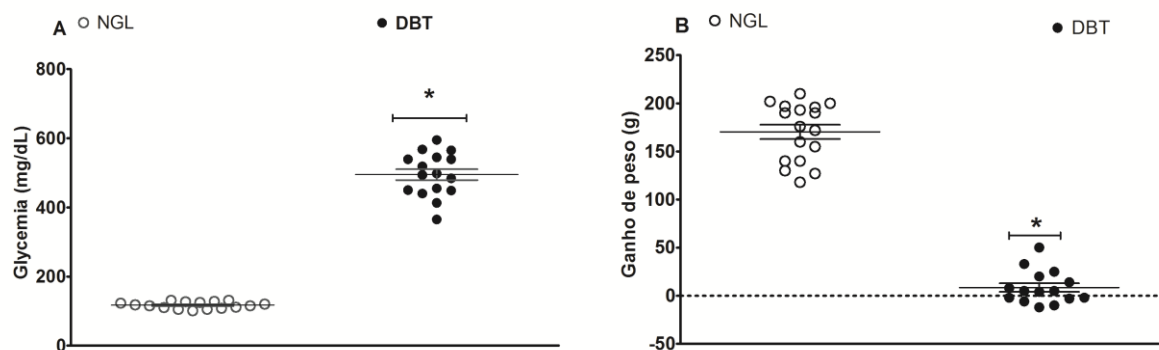


Figura 4. Comparação de (A) glicemia e (B) ganho de peso entre animais normoglicêmicos e diabéticos expostos ao condicionamento com choque. Valores estão representados em média \pm EPM; $n = 10 - 12$; $*p < 0.05$ comparado ao grupo NGL-DBT.

Efeito do condicionamento com choque sobre a extinção de memória aversiva contextual em animais normoglicêmicos e diabéticos

O teste *t* de Student mostrou que animais diabéticos (DBT) possuem maior dificuldade na extinção da memória aversiva contextual, apresentando uma diferença significativa ($p < 0,05$) no tempo de congelamento, quando comparado aos controles normoglicêmicos (NGL), em todas as sessões teste (S1, S2 e S3).

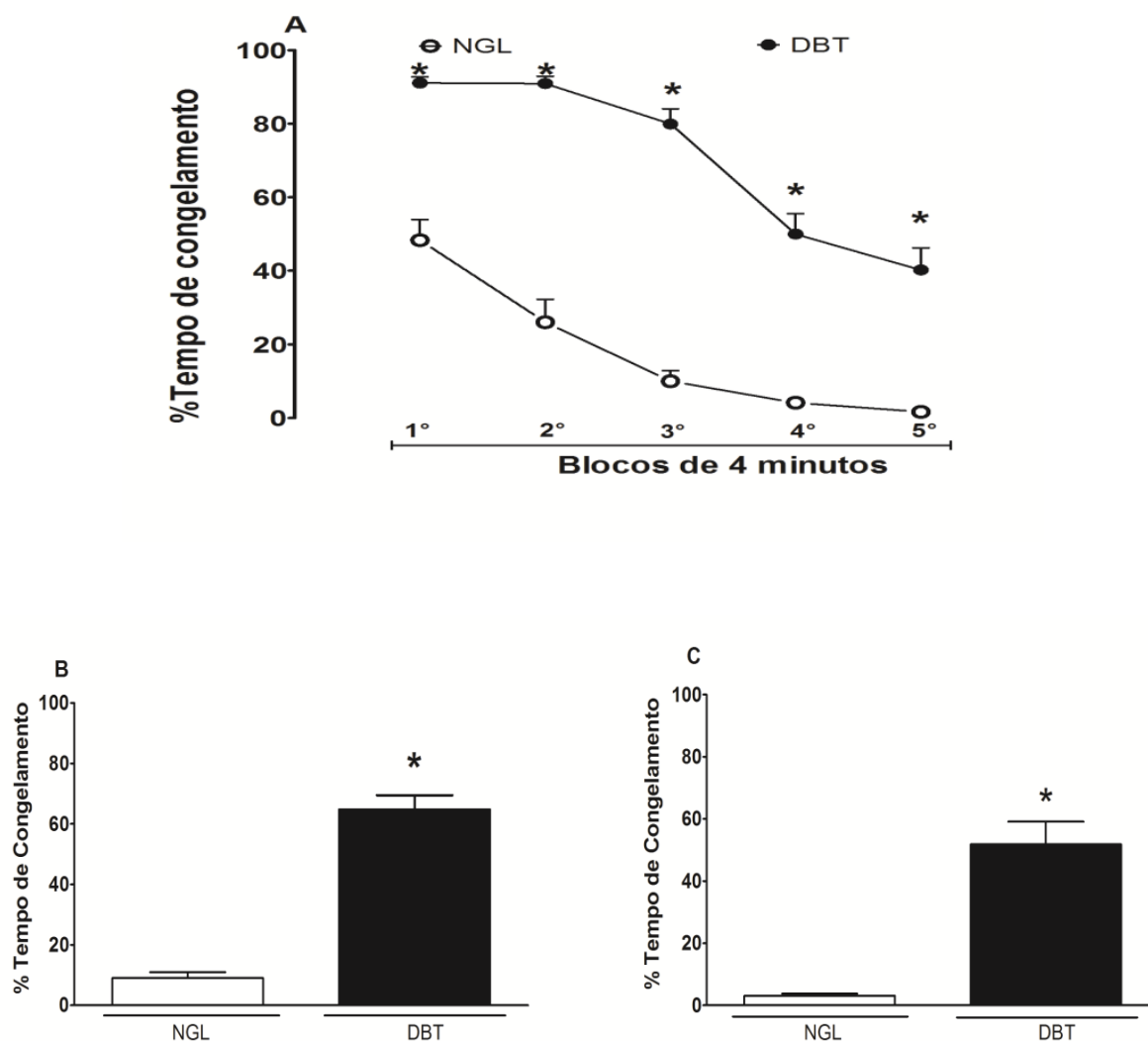


Figura 5. Efeito do condicionamento em animais diabéticos e normoglicêmicos, sobre extinção de memória aversiva contextual. (A) sessão de treino de extinção; (B) sessão de teste de extinção, e (C) sessão recuperação de memória. Valores estão representados em média \pm EPM; $n = 10 - 12$; * $p < 0.05$ comparado ao grupo NGL-DBT.

Efeito do condicionamento com choque sobre parâmetros de ansiedade em animais Normoglicêmicos e Diabéticos

A ANOVA de duas vias mostrou que animais normoglicêmicos condicionados com choque (NGL/COND) reduziram significativamente ($p < 0,05$) o número de afundamentos de cabeça (FIGURA 5B) e o tempo de permanência nos braços

abertos (FIGURA 5C), quando comparados aos normoglicêmicos que não receberam choque (NGL). As análises estatísticas demonstraram ainda, que os animais diabéticos condicionados (DBT/COND) e não condicionados (DBT), quando comparados aos animais normoglicêmicos (NGL e NGL/COND) possuem diferenças significativas ($p < 0,05$) em todos os parâmetros avaliados de comportamento do tipo ansiedade.

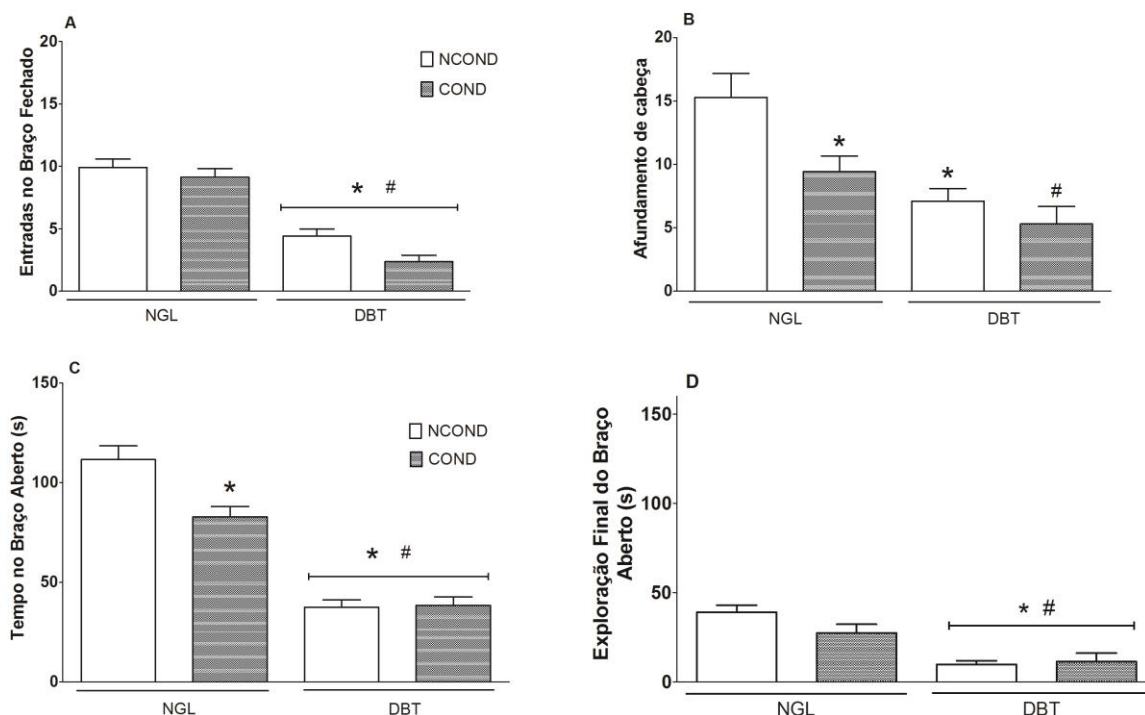


Figura 6. Efeito do condicionamento com choque em animais diabéticos e normoglicêmicos sobre o (A) Entradas nos braços fechados, (B) Afundamentos de cabeça, (C) tempo nos braços abertos e (D) Exploração final dos braços abertos. Valores estão representados em média \pm EPM; $n=10 - 12$; * $p < 0.05$ comparado ao grupo NGL/NCOND, # $p < 0,05$ comparado ao grupo NGL/COND.

EXPERIMENTO 2

Parâmetros de glicemia e ganho de peso de animais normoglicêmicos e diabéticos

O teste *t* de Student mostrou que animais diabéticos possuem um aumento significativo da glicemia (Figura 7A; $p < 0,05$) e redução do ganho de peso (FIGURA 7B; $p < 0,05$) quando comparados aos animais normoglicêmicos.

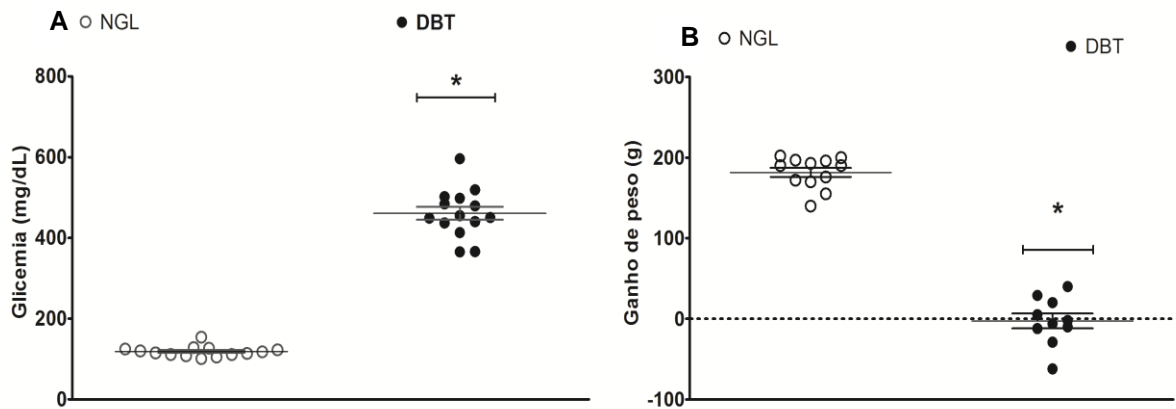
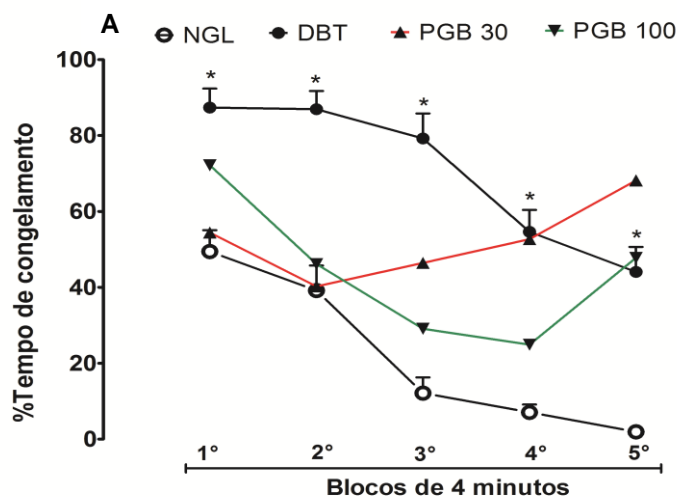


Figura 7. Comparação de (A) glicemia e (B) ganho de peso entre animais normoglicêmicos e diabéticos. Valores estão representados em média \pm EPM; $n=10-12$; * $p<0.05$ comparado ao grupo NGL-DBT.

Efeito do tratamento com Pregabalina sobre a extinção de memória aversiva contextual em animais diabéticos.

A ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman Keuls mostrou que animais diabéticos (DBT) possuem maior dificuldade na extinção da memória aversiva contextual, apresentando uma diferença significativa ($p<0,05$) no tempo de congelamento, quando comparado aos controles normoglicêmicos (NGL), em todas as sessões teste (S1, S2 e S3). O tratamento com pregabalina (0, 30 e 100 mg/kg), produziu efeitos reduzindo significativamente ($p<0,05$), o tempo de congelamento dos animais, principalmente nas sessões S2 e S3.



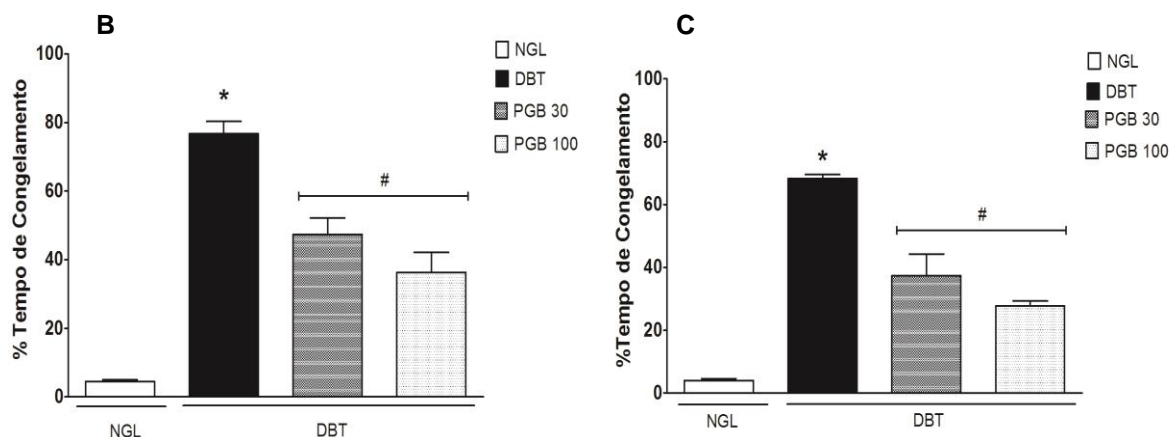


Figura 8. Efeito do tratamento com pregabalina (PGB, 30 e 100 mg/kg) em animais diabéticos (DBT) sobre o tempo de congelamento na (A) sessão treino de extinção (S1) de memória aversiva contextual, (B) sessão de teste de extinção (S2), e (C) sessão recuperação de memória (S3). Valores estão representados em média \pm EPM; $n=10-12$; * $p<0.05$ comparado ao grupo NGL-DBT, # $p<0,05$ comparado ao grupo DBT-PGB.

Efeito do tratamento com Pregabalina sobre parâmetros de ansiedade em animais Diabéticos

A ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman Keuls mostrou que entre os animais diabéticos tiveram uma redução significativa ($p<0,05$) no número de entradas nos braços fechados (FIGURA 9A), no número de afundamentos de cabeça (FIGURA 9B), no tempo de permanência nos braços abertos (FIGURA 9C), e no tempo de permanência no final dos braços abertos (FIGURA 9D), quando comparados aos normoglicêmicos (NGL). As análises estatísticas demonstraram ainda que os animais tratados com pregabalina (30 e 100 mg/kg) tiveram melhoras significativas ($p<0,05$) em relação aos controles diabéticos, aumentando o tempo de permanência nos braços abertos (FIGURA 9C), e o número de afundamentos da cabeça (FIGURA 9B). Na maior dose (100 mg/kg), foi verificado ainda um aumento significativo no tempo de permanência no final dos braços abertos. Portanto, os dados evidenciam um comportamento do tipo ansioso, induzido pelo diabetes e sugere que o tratamento com pregabalina produza um efeito do tipo ansiolítico nos animais.

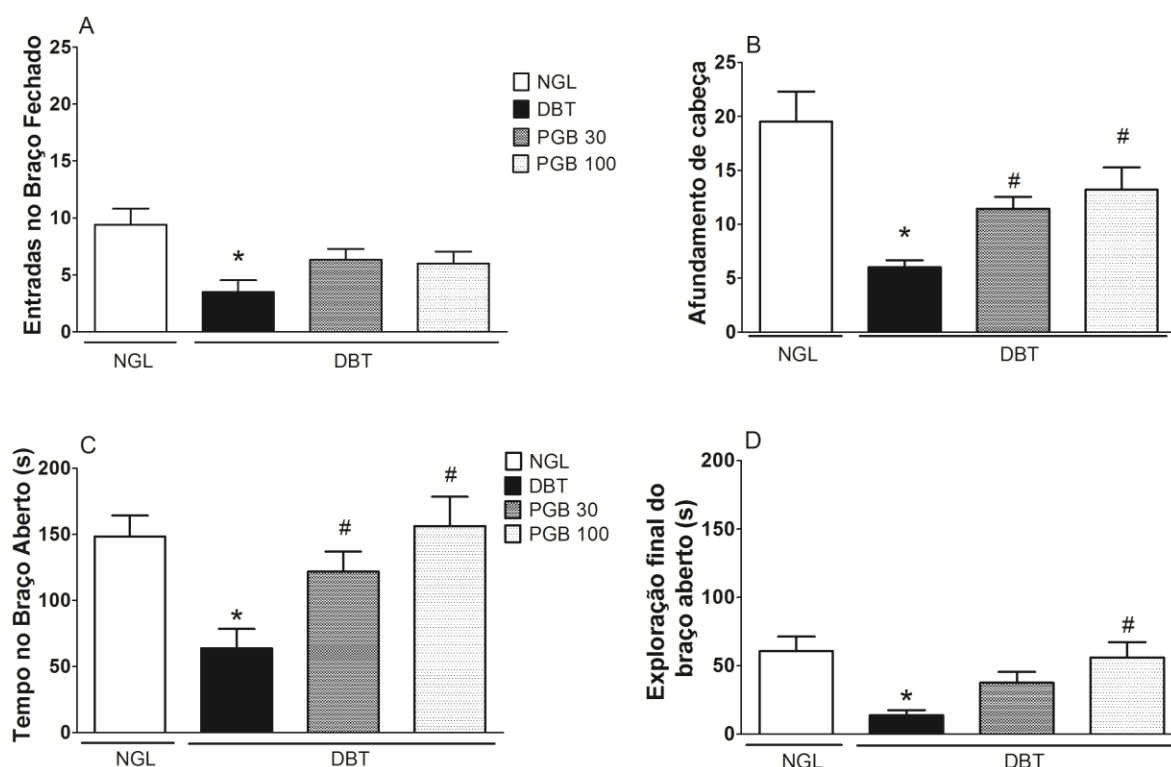


Figura 9. Efeito do tratamento com pregabalina (PGB 0, 30 e 100 mg/kg) em animais diabéticos (DBT) sobre comportamento tipo ansioso. (A) Entrada nos braços fechados; (B) Afundamento de cabeça; (C) Tempo no braço aberto; (D) Exploração final do braço aberto. Valores estão representados em média \pm EPM; $n=10-12$; * $p<0.05$ comparado ao grupo NGL-DBT; # $p<0,05$ comparado ao grupo DBT-PGB.

5 DISCUSSÃO

O modelo animal de indução ao diabetes DMI pela injeção de STZ tem-se mostrado de grande importância para o entendimento das alterações bioquímicas e comportamentais provocados pela hiperglicemia. Nossos dados demonstraram através das alterações de glicemia, ganho de peso e dos testes comportamentais, que os animais diabéticos apresentam de fato mudanças significativas quando comparados aos animais normoglicêmicos. Reforçamos também estudos que mostram que animais diabéticos apresentam comportamento do tipo ansioso mais pronunciado quando comparada com animais não diabéticos (Wayhs et al., 2010,

2013; de Moraes et al., 2014; Gambeta et al., 2015; Rebolledo-Solleiro et al., 2016; de Souza et al., 2018), e confirmamos dados recentes do nosso laboratório de que o DMI prejudica a extinção de memória aversiva contextual (de Souza et al., 2018). É importante ressaltar que a STZ é transportada para o interior das células β pancreáticas através do transportador GLUT-2, o qual não está presente na barreira hematoencefálica (Kumagai et al., 1999). Dessa forma, a possibilidade de a STZ causar danos diretos no SNC pode ser excluída, sendo esses efeitos comportamentais atribuídos à condição metabólica da hiperglicemia causada pelo quadro de indução ao diabetes.

Os resultados obtidos no experimento 1, livre de drogas, demonstrou que o condicionamento com choque por si só é capaz de provocar alterações comportamentais significativas. Assim, observamos que os animais normoglicêmicos foram capazes de extinguir a memória aversiva contextual quase completamente e este efeito foi duradouro, pois quando os animais foram reexpostos após sete dias do condicionamento eles não apresentaram uma resposta de congelamento, ou seja, mostrando ter extinguido a memória aversiva contextual. Diferentemente, os animais diabéticos, um dia ou 7 dias após ao condicionamento aversivo ao contexto, apresentaram resposta exacerbada de congelamento, demonstrando com isso haver um prejuízo na extinção dessa memória aversiva ou uma super consolidação dessa memória. Esse resultado está de acordo com dados recentes do laboratório (de Souza et al., 2018), que demonstrou a eficácia do modelo de indução ao diabetes, levando a hiperglicemia crônica e resultando em comportamentos do tipo ansiedade e dificuldade na extinção da memória aversiva. Os animais normoglicêmicos e diabéticos que foram expostos ao contexto no dia do condicionamento, mas que não receberam choque nas patas, não apresentaram resposta de congelamento nas sessões testes subsequentes (sessão 2 e 3; dados não mostrados).

Quanto aos resultados de ansiedade, observamos que independente se os animais foram ou não condicionados ao contexto, os animais diabéticos apresentaram um comportamento do tipo ansioso mais expressivo quando comparado aos normoglicêmicos e este não difere entre os grupos (condicionado e não condicionado). Este efeito observado em animais diabéticos corrobora com outros estudos (Bandelow et al., 2016; Libby 2002; Vogelzangs et al. 2013; de Moraes et al., 2014; Gambeta et al., 2015; Rebolledo-Solleiro et al., 2016; de Souza et al., 2018). Já entre os normoglicêmicos, o condicionamento aversivo ao contexto

induziu um comportamento do tipo ansioso mais expressivo e duradouro, uma vez que os animais foram condicionados sete dias antes de serem submetidos ao teste do LCE. Importante ressaltar que as alterações metabólicas causadas pelo diabetes estão relacionadas com essas alterações comportamentais mais expressivas observadas em nosso laboratório e também por outros grupos (Gambeta et al., 2015; Gupta et al. 2014; Can et al. 2011; Aksu et al. 2012; Ates et al. 2014), talvez por isso o condicionamento com choque não seja capaz de produzir efeitos ainda mais expressivos.

O quadro de hiperglicemia crônica provoca alterações na homeostase metabólica do organismo, afetando especialmente o funcionamento do sistema nervo central (SNC). Devido ao aumento de espécies reativas de oxigênio, morte neuronal, desregulação de neurotransmissores e aumento de glicocorticoides, a presença de fatores inflamatórios tem sido identificada e relacionada à hiperglicemia por diversos estudos (Gao e Zheng 2014; Pickup et al., 1998; Lutgendorf et al., 1999; Pitocco et al. 2010; de Moraes et al., 2014; da Silva Dias et al., 2015; Zanolini et al. 2015). Dados do nosso grupo (da Silva Dias et al., 2015) mostraram em um estudo que animais diabéticos apresentam um aumento de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1-beta, interleucina-6 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) em áreas do encéfalo como o córtex pré-frontal e o hipocampo apenas após quatro semanas da indução do diabetes com STZ. Neste mesmo período e nessas mesmas áreas encefálicas, esses animais mostram um aumento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e aumento de lipoperoxidação lipídica, indicativo de aumento de estresse oxidativo (de Moraes et al., 2014). Os trabalhos relacionam a disfunção cerebral devido à morte neuronal por estresse oxidativo/inflamação, como um fator importante que associa o diabetes a essas psicopatologias (de Moraes et al. 2014; da Silva Dias et al., 2015).

Tendo em vista todas essas alterações no sistema nervoso central, o tratamento com pregabalina justifica-se pelo fato de ser uma droga que atuaria por amenizar os danos e reduzir a excitabilidade na comunicação entre as células. Salat e colaboradores (2016) avaliaram os efeitos do tratamento com pregabalina em camundongos diabéticos, e relataram uma diminuição da expressão de proteínas inflamatórias nos animais tratados. Os autores observaram uma redução significativa de Ciclooxygenase-2 (COX-2), prostaglandina E sintase (PTGES), e fator nuclear kappa B (NF- κ B p50) e um aumento da expressão de reguladores da inflamação,

como o Receptor de hidrocarboneto de arilo (AhR) e o Fator nuclear derivado de eritóide 2 (Nrf2), sugerindo uma ação anti-inflamatória e neuroprotetora da pregabalina.

Nossos dados demonstraram efeitos benéficos após uma única injeção de pregabalina, ou seja, a pregabalina acelerou a extinção da memória aversiva e este efeito foi duradouro, pois o mesmo se manteve após 7 dias da injeção aguda. Este tratamento agudo também foi capaz de melhorar os comportamentos do tipo ansioso de animais diabéticos, um efeito também duradouro, uma vez que os animais haviam recebido o tratamento 7 dias antes do teste. No trabalho de Jang e colaboradores (2012), a partir do modelo neuropatia em camundongos, a pregabalina demonstrou efeitos imunomodulatórios, inibindo a atividade das células Natural Killers (NK) e a proliferação de esplenócitos. Ainda mais, Há e colaboradores (2011) indicaram menor síntese de caspase-3, mitogen-activated protein kinase p38 (MAPK p38) e diminuição da proliferação de astrócitos em ratos com lesão medular após administração de pregabalina. No trabalho de Zohar e colaboradores (2008), foram também relatados efeitos ansiolíticos agudos no tratamento com diferentes doses de pregabalina utilizando um modelo de estresse pós-traumático em animais normoglicêmicos. Ainda, é importante ressaltar outros efeitos já evidenciados da pregabalina. Efeitos analgésicos tem sido relatados em diversos trabalhos utilizando pregabalina para o tratamento de patologias ligadas a dor como neuralgia pós-herpética (Dworkin et al., 2003; Sabatowskiet al., 2004), neuropatia diabética (Richter et al., 2005; Rosenstock et al., 2004), distúrbios do sono, fibromialgia (Crofford et al., 2005) e dor subsequente de lesão medular (Siddall et al., 2006). Foi demonstrado experimentalmente por Salat e colaboradores (2013), que a pregabalina também possui eficácia no tratamento da alodinia tátil e hiperalgesia térmica, aumentando o limiar de dor desses animais em 168% quando comparado aos controles diabéticos. Ainda mais, as evidências sugerem importantes efeitos da pregabalina em transtornos de ansiedade generalizada (Field et al., 2001; Feltner et al., 2003; Pande et al., 2003; Pohl et al., 2005).

Estudos de condicionamento e extinção de medo demonstram que os processos de aprendizado e memória estão intimamente relacionados ao contexto. Esses processos ativam áreas neurais que englobam o hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal (Maren et al., 2013). Interpretações inadequadas e imprecisas do contexto ativam essas áreas de maneira distinta e desproporcional o que precipita

ou agrava essas psicopatologias como o TEPT (Maren et al., 2013). Como já relatado, as alterações metabólicas causadas pela hiperglicemia crônica estão relacionadas a processos inflamatórios que podem também desencadear efeitos que se manifestam em nível estrutural, neurofisiológico e neuropsicológico (Muriach et al., 2014). Ainda mais, evidências indicam que o quadro inflamatório leva a danos na neurogênese hipocampal (Wang et al., 2009), sugerindo assim, que o diabetes e psicopatologias, como o TEPT, compartilham alterações e mecanismos neurofisiológicos comuns. Acreditamos, portanto, que a pregabalina possa ter afetado positivamente a extinção da memória aversiva contextual, a partir da diminuição dos fatores inflamatórios (Salat et al., 2016; Jang et al., 2012; Há et al., 2011) e da melhora dos parâmetros de ansiedade (Field et al., 2001; Feltner et al., 2003; Pande et al., 2003).

7. CONCLUSÃO

A atual discussão sobre a relação bidirecional entre o diabetes e as psicopatologias, evidencia que o processo inflamatório do sistema nervoso central (SNC) é um dos importantes mecanismos comuns entre as doenças. O quadro diabético de hiperglicemia crônica, assim como a desregulação de neurotransmissores presentes na fisiopatologia do TAG e do TEPT, levam ao desenvolvimento de fatores inflamatórios, aumentando espécies reativas de oxigênio, citocinas pró-inflamatórias, morte neuronal e aumento de glicocorticoides (Gao e Zheng 2014; Pickup et al., 1998; Lutgendorf et al., 1999; Pitocco et al. 2010; de Moraes et al., 2014; da Silva Dias et al., 2015; Zanolini et al. 2015). Ainda mais, essa relação se mostra consistente ao afetar também as mesmas regiões estruturais do cérebro, como o hipocampo, amígdala e o córtex pré-frontal. A partir das evidências relatadas na literatura e sustentada por nossos dados, acreditamos que a pregabalina tenha melhorado o processo de extinção de memória aversiva contextual, devido aos seus efeitos ansiolíticos e anti-inflamatórios. A pregabalina, portanto, apresenta potencial interessante para o tratamento e entendimento dos mecanismos fisiopatológicos das comorbidades relacionadas ao diabetes, podendo ser uma alternativa terapêutica viável e promissora, que deve continuar a ser investigada.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKSU I, ATES M, BAYKARA B, KIRAY M, SISMAN AR, BUYUK E, BAYKARA B, CETINKAYA C, GUMUS H, UYSAL N., 2012. **Anxiety correlates to decreased blood and prefrontal cortex IGF-1 levels in streptozotocin induced diabetes.** *Neurosci Lett.* :176-81.
- ATES M, DAYI A, KIRAY M, ET AL. (2014) **Anxiety and depression-like behavior are correlated with leptin and leptin receptor expression in prefrontal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats.** *Biotech Histochem* 89:161–171.
- ANDERSON, R.J.; FREEDLAND, K.E.; CLOUSE, R.E.; LUSTMAN, P.J., 2001. **The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a meta-analysis.** *Diabetes Care*, 24(6):1069–1078.
- BANDELOW B, BALDWIN D, ABELLI M, ET AL. (2016). **Biological markers for anxiety disorders, OCD and PTSD: A consensus statement. Part II: Neurochemistry, neurophysiology and neurocognition.** *World J Biol Psychiatry*;18(3):162-214.
- BELLUSH LL, ROWLAND NE., 1989. **Stress and behavior in streptozotocin diabetic rats: biochemical correlates of passive avoidance learning.** *BehavNeurosci.*: 144-50.
- BELLUSH, L. L., REID, S. G., AND NORTH, D., 1991. **The Functional significance of biochemical alterations in streptozotocin-induced diabetes.** *Physiol. Behav.* 50, 973-981.
- BIESSELS GJ, KAMAL A, RAMAKERS GM, URBAN IJ, SPRUIJT BM, ERKELENS DW, GISPEN WH., 1996. **Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats.** *Diabetes.*; 1259-66.
- BITENCOURT RM, PAMPLONA FA, TAKAHASHI RN., 2008. **Facilitation of contextual fear memory extinction and anti-anxiogenic effects of AM404 and cannabidiol in conditioned rats.** *EurNeuropsychopharmacol.*; (12):849-59.
- BRODERICK PA, JACOBY JH., 1989. **Central monoamine dysfunction in diabetes: psychotherapeutic implications: electroanalysis by voltammetry.** *ActaPhysiolPharmacolLatinoam.* ;39(3):211-25.
- BYSTRITSKY A., KORB A. S., DOUGLAS P. K., COHEN M. S., MELEGA W. P., MULGAONKAR A. P., ET AL., 2011. **A review of low-intensity focused ultrasound pulsation.** *Brain Stimulation*, 4 (3), 125– 136. 30

- BRESLAU, N. (2002). **Epidemiologic studies of trauma, posttraumatic stress disorder, and other psychiatric disorders.** Canadian Journal of Psychiatry–Revue Canadienne de Psychiatrie, 47(10), 923-929.
- CAMMAROTA M, BEVILAQUA LR, ROSSATO JI, RAMÍREZ MR, MEDINA JH AND IZQUIERDO I. 2005.**Relationship between short- and long-term memory and short- and long-term extinction.**NeurobiolLearn Mem 84: 25-32.
- CAN OD, OZTÜRK Y, OZKAY UD (2011) **Effects of insulin and St. John's wort treatments on anxiety, locomotory activity, depression, and active learning parameters of streptozotocin-diabetic rats.** Planta Med 77:1970–1976
- CLAVIJO M, CARVALHO JJ, RIOS M, DE OLIVEIRA IR., 2006. **Psychiatric disorders in patients with diabetes type 2 at medical care and training district of Rio Branco-Acre, Brazil.**Arquivos de Neuro-Psiquiatria.; 64(3B):807-13.
- COHEN, H., GEVA, A.B., MATAR, M.A., ZOHAR, J., KAPLAN, Z., 2008.**Post-traumatic stress behavioural responses in inbred mouse strains: can genetic predisposition explain phenotypic vulnerability?** Int. J. Neuropsychopharmacol. 11, 331–349.
- CONNOR, K.M., DAVIDSON, J.R., WEISLER, R.H., ZHANG, W., ABRAHAM, K.,2006. **Tiagabine for posttraumatic stress disorder: effects of open-label and double-blind discontinuation treatment.** Psychopharmacology 184, 21–25.
- DE GROOT M, ANDERSON R, FREEDLAND KE, CLOUSE RE, LUSTMAN PJ., 2001. **Associationofdepressionand diabetes complications: a meta-analysis.** Psychosomatic Medicine.;63(4):619-30.
- DE SOUZA CP, GAMBETA E, STERN CAJ, ZANOVELI JM. **Posttraumatic stress disorder-type behaviors in streptozotocin-induced diabetic rats can be prevented by prolonged treatment with vitamin E.** Behav Brain Res. 2018 Sep 13.
- DE MORAIS H, DE SOUZA CP, DA SILVA LM, FERREIRA DM, WERNER MF, ANDREATINI R, DA CUNHA JM, ZANOVELI JM., 2013. **Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behavior in streptozotocin-diabetic rats.** Behav Brain Res. Oct 16. 31
- BRESLAU, N. (2002). **Epidemiologic studies of trauma, posttraumatic stress disorder, and other psychiatric disorders.** Canadian Journal of Psychiatry–Revue Canadienne de Psychiatrie, 47(10), 923-929.

- CAMMAROTA M, BEVILAQUA LR, ROSSATO JI, RAMÍREZ MR, MEDINA JH AND IZQUIERDO I. 2005.**Relationship between short- and long-term memory and short- and long-term extinction.**NeurobiolLearn Mem 84: 25-32.
- CAN OD, OZTÜRK Y, OZKAY UD (2011) **Effects of insulin and St. John's wort treatments on anxiety, locomotory activity, depression, and active learning parameters of streptozotocin-diabetic rats.** Planta Med 77:1970–1976
- CLAVIJO M, CARVALHO JJ, RIOS M, DE OLIVEIRA IR., 2006. **Psychiatric disorders in patients with diabetes type 2 at medical care and training district of Rio Branco-Acre, Brazil.**Arquivos de Neuro-Psiquiatria.; 64(3B):807-13.
- COHEN, H., GEVA, A.B., MATAR, M.A., ZOHAR, J., KAPLAN, Z., 2008.**Post-traumatic stress behavioural responses in inbred mouse strains: can genetic predisposition explain phenotypic vulnerability?** Int. J. Neuropsychopharmacol. 11, 331–349.
- CONNOR, K.M., DAVIDSON, J.R., WEISLER, R.H., ZHANG, W., ABRAHAM, K.,2006. **Tiagabine for posttraumatic stress disorder: effects of open-label and double-blind discontinuation treatment.** Psychopharmacology 184, 21–25.
- DE GROOT M, ANDERSON R, FREEDLAND KE, CLOUSE RE, LUSTMAN PJ., 2001. **Associationofdepressionand diabetes complications: a meta-analysis.** Psychosomatic Medicine.;63(4):619-30.
- DE SOUZA CP, GAMBETA E, STERN CAJ, ZANOVELI JM. **Posttraumatic stress disorder-type behaviors in streptozotocin-induced diabetic rats can be prevented by prolonged treatment with vitamin E.** Behav Brain Res. 2018 Sep 13.
- DE MORAIS H, DE SOUZA CP, DA SILVA LM, FERREIRA DM, WERNER MF, ANDREATINI R, DA CUNHA JM, ZANOVELI JM., 2013. **Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behavior in streptozotocin-diabetic rats.** Behav Brain Res. Oct 16. 31
- DETKE, M.J.; RICKELS, M.; LUCKI, I., 1995. **Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants.**Psychopharmacology (Berl), 121(1):66-72.
- DO-MONTE FHM, KINCHESKI GC, PAVESI E, SORDI R, ASSREUY J, CAROBREZ AP., 2010.**Role of beta-adrenergic receptors in the ventromedial prefrontal cortex during contextual fear extinction in rats.** Neurobiologyof Learning and Memory.;94(3):318–328.

- DSM-V - **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. Porto Alegre, d. Artes Médicas, 2013.
- FIELD, M.J., OLES, R.J., SINGH, L., 2001. **Pregabalin may represent a novel class of anxiolytic agents with a broad spectrum of activity**. Br. J. Pharmacol. 132, 1–4.
- FRIEDMAN, M. J.; SCHNURR, P. P., 1995. **The relationship between trauma, post-traumatic stress disorder, and physical health**. Neurobiological and clinical consequences of stress: From normal adaptation to post-traumatic stress disorder (pp. 507-524).
- GAMBETA, E.; DE SOUZA, C.P.; DE MORAIS, H.; ZANOVELI, J.M., 2016. **Reestablishment of the hyperglycemia to the normal levels seems not to be essential to the anxiolytic-like effect induced by insulin**. Metabolic Brain Disease, 1-9.
- GOLDSTEIN, L.E.; LEOPOLD, M.C.; HUANG, X.; ATWOOD, C.S.; SAUNDERS, A.J.; HARTSHORN, M., 2000. **3-Hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid generate hydrogen peroxide and promote alpha-crystallin cross-linking by metal ion reduction**. Biochemistry, 39(24):7266–75.
- GRIGSBY AB, ANDERSON RJ, FREEDLAND KE, CLOUSE RE, LUSTMAN PJ., 2002. **Prevalence of anxiety in adults with diabetes: a systematic review**. J Psychosom Res.; 53 (6) :1053-60.
- GUPTA D, RADHAKRISHNAN M, KURHE Y., 2014. **Insulin reverses anxiety-like behavior evoked by streptozotocin-induced diabetes in mice**. Metab Brain Dis.
- GUPTA, D.; RADHAKRISHNAN, M.; KURHE, Y., 2014. **Ondansetron, a 5HT₃ receptor antagonist reverses depression and anxiety-like behavior in streptozotocin-induced diabetic mice: possible implication of serotonergic system**. Eur J Pharmacol, 744:59-66. 32
- GAO F, ZHENG ZM (2014) **Animal models of diabetic neuropathic pain**. ExpClinEndocrinol Diabetes Off J GerSocEndocrinolGer Diabetes Assoc 122:100–106.
- HERZER, MICHELE, AND KOREY K. HOOD., 2010. **Anxiety Symptoms in Adolescents with Type 1 Diabetes: Association with Blood Glucose Monitoring and Glycemic Control**. Journal of Pediatric Psychology 35.4: 415–425.
- HA K-Y, CARRAGEE E, CHENG I. (2011) **Pregabalin as a neuroprotector after spinal cord injury in rats: biochemical analysis and effect on glial cells**. J Korean Med Sci 26:404–411.

- HENNEMANN-KRAUSE, Lilian; SREDNI, Sidney. **Farmacoterapia sistêmica da dor neuropática**. Rev. dor, São Paulo, v. 17, supl. 1, p. 91-94, 2016.
- HILAKIVI-CLARKE LA, WOZNIAK KM, DURCAN MJ, LINNOILA M., 1990. **Behavior of streptozotocin diabetic mice in tests of exploration, locomotion, anxiety, depression and aggression**. Physiology & Behavior.; Sep;48(3):429-33.
- HILAKIVI-CLARKE, L., ET AL., 2004. **In Utero Alcohol Exposure Increases Mammary Tumorigenesis in Rats**. British Journal of Cancer 90.11: 2225–2231.
- HUANG Z, ET AL., 2013. **A functional variomics tool for discovering drug-resistance genes and drug targets**. Cell Rep 3(2):577-85.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, IDF ATLAS, 8th ed. Belgium. 2017
- JANG Y, SONG H-K, YEOM MY, JEONG DC (2012) **The immunomodulatory effect of pregabalin on spleen cells in neuropathic mice**. Anesth Analg 115:830–836.
- JULIANA A.V.KROON; ANTONIO PÁDUA CAROBREZ., 2009. **Olfactory fear conditioning paradigm in rats: Effects of midazolam, propranolol or scopolamine** Neurobiology of Learning and Memory. Volume 91, Issue 1, January Pages 32-40.
- KAMEI J, MIYATA S, MORITA K, SAITOH A, TAKEDA H., 2003. **Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on immobility time in the tail suspension test in streptozotocin-induced diabetic mice**. Pharmacol Biochem Behav. May;75(2):247-54.
- KAMEI M., TESHIMA K., FUKUSHIMA N., NAKAMURA T., 2001. **Investigation of patients' demand for community pharmacies: relationship between pharmacy services and patient satisfaction**. Yakugaku Zasshi.;121:215–220.
- KAVOUSSI, R., 2006. **Pregabalin: from molecule to medicine**. Eur. Neuropsychopharmacol. 16 (Suppl 2), S128–S133. 33
- KARUNANAYAKE EH, HEARSE DJ, MELLOWS G. **The synthesis of [14C] streptozotocin and its distribution and excretion in the rat**. Biochem J. 1974 Sep;142(3):673-83.
- LERNMARK B.; PERSSON B.; FISHER L.; ET AL., 1999. **Symptoms of depression are important to psychological adaptation and metabolic control in children with diabetes mellitus**. Diabetic Medicine 16, 14-22.
- LERNMARK A., 1999. **Selecting culprits in type 1 diabetes beta-cell killing**. J Clin Invest. Dec;104(11):1487-9.

- LIN, ELIZABETH H.B., AND MICHAEL., 2008. **On behalf of the WHO WMH Survey Consortium. Mental Disorders among Persons with diabetes—Results from the World Mental Health Surveys.** Journal of psychosomatic research 65.6 : 571–580.
- LIBBY P. **Inflammation in atherosclerosis.** Nature. 2002;420:868–874.
- LUSTMAN, P.J.; CLOUSE, R.E., 2005.**Depression in diabetic patients: The relationship between mood and glycemic control.**Journal of Diabetes and its Complications, 19:113–122.
- MAGARIÑOS AM, MCEWEN BS., 2000. **Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress.** Proc Natl AcadSci U S A. Sep 26;97(20):11056-61.
- MAZOR, A., MATAR, M.A., KAPLAN, Z., KOZLOVSKY, N., ZOHAR, J., COHEN, H., IN PRESS. **Gender-related qualitative differences in baseline and post stress anxiety responses are not reflected in the incidence of criterion-based PTSD-like behavior patterns.** World J. Biol. Psychiatry 1–14.
- MCEWEN, BRUCE S. ET AL.,2012. **Stress and Anxiety: Structural Plasticity and Epigenetic Regulation as a Consequence of Stress.** Neuropharmacology 62.1 3–12.
- MIYATA S, YAMADA N, HIRANO S, TANAKA S, KAMEI J. **Diabetes attenuates psychological stress-elicited 5-HT secretion in the prefrontal cortex but not in the amygdala of mice.** Brain
- NICOLAS, L.B., KLEIN, S., PRINSEN, E.P. 2007.**Defensive-like behaviors induced by ultrasound: further pharmacological characterization in Lister-hooded rats.** Psychopharmacology (Berl) 194, 243–252.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY., M 1985. **Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat.** J. Neurosci. Methods, 14:149-167. 34
- PITOCCO D, ZACCARDI F, DI STASIO E, ROMITELLI F, SANTINI SA, ZUPPI C, GHIRLANDA G (2010) **Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes.** Rev Diabet Stud 7:15–25.
- RICKELS K, POLLACK MH, FELTNER DE, LYDIARD RB, ZIMBROFF DL, BIELSKI RJ, TOBIAS K, BROCK JD, ZORNBERG GL, PANDE AC., 2005. **Pregabalin for Treatment of Generalized Anxiety DisorderA 4-Week, Multicenter, Double-blind, Placebo-Controlled Trial of Pregabalin and Alprazolam.** Arch Gen Psychiatry.; 1022–1030. doi:10.1001/archpsyc.62.9.1022

- RUIZ-GOMEZ, M., COUTTS, N., PRICE, A., TAYLOR, M.V., BATE, M.; 2000. **Drosophila dumbfounded: a myoblast attractant essential for fusion.** Cell 102(2): 189--198.
- SALAŁ, KINGA ET AL., 2016. **Effect of Pregabalin on Contextual Memory Deficits and Inflammatory State-Related Protein Expression in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice.** Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 389: 613–623.
- SCHEIN PS.,1969. **1-methyl-1-nitrosourea depression of brain nicotinamide adenine dinucleotide in the production of neurologic toxicity.** Proc SocExpBiol Med.;517–520.
- SHABAN MC, FOSBURY J, KERR D, CAVAN DA., 2006. **The prevalence of depression and anxiety in adults with Type 1 diabetes.**Diabet Med.;1381-4.
- SMITH KJ, GARIÉPY G, PEDNEAULT M, BELAND M, CLYDE M, SCHMITZ N., 2013. **Exploring the association of psychological status with self-rated diabetes control: results from the Montreal evaluation of diabetes treatment study.** Psychosomatics.; Jan-Feb;54(1):35-43.
- TARUI S, YAMADA K, HANAFUSA T., 1987. **Animal models utilized in the research of diabetes mellitus--with special reference to insulitis-associated diabetes.** ProgClinBiol Res.;229:211-23.
- TRIEF PM, OUIMETTE P, WADE M, SHANAHAN P, WEINSTOCK RS., 2006. **Posttraumatic stress disorder and diabetes: co-morbidity and outcomes in a male veterans sample.** J Behav Med.;29(5):411–8.
- TUCKER, P., TRAUTMAN, R.P., WYATT, D.B., THOMPSON, J., WU, S.C.,CAPECE, J.A., ROSENTHAL, N.R., 2007. **Efficacy and safety of topiramate monotherapy in civilian posttraumatic stress disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled study.** J.Clin. Psychiatry 68, 201–206.
- VAIVA, G.; DUCROCQ, F.; JEZEQUEL, K.; ET AL., 2003.**Immediate treatment with propranolol decrease posttraumatic stress disorder two months after trauma.** Biological Psychiatry, 54, 947-949. 35
- VALENTINA MAGNI ,CLAUDIO FACCENNA ,JEROEN VAN HUNEN , FRANCESCA FUNICIELLO. **Delamination vs. break-off: the fate of continental collision.**
- VOGELZANGS N, BEEKMAN AT, DE JONGE P, PENNINX BW. **Anxiety disorders and inflammation in a large adult cohort.** Transl Psychiatry. 2013
- W. R. MILES AND H. F. ROOT, **Root HF Psychologic tests applied in diabetic patients.**Archives of Internal Medicine, vol. 30, pp.767–770, 1922.

ZANOVELI JM, MORAIS H, DIAS ICS, SCHREIBER AK, SOUZA CP, CUNHA JM (2015)
Depression associated with diabetes: from pathophysiology to treatment.
Current Diabetes Review

ZUNG A, BLUMENFELD O, SHEHADEH N, DALLY GOTTFRIED O, TENENBAUM
RAKOVER Y, HERSHKOVITZ E, GILLIS D, ZANGEN D, PINHAS-HAMIEL O,
HANUKOGLUA, RACHMIEL M, SHALITIN S; ISRAEL IDDM REGISTRY STUDY
GROUP., 2012. **Increase in the incidence of type 1 diabetes in Israeli children
following the Second Lebanon War.** Pediatr Diabetes. 326-33.